

REST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-17796

(43) 公開日 平成5年(1993)1月26日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 11 B	1/10	2115-4H		
	1/02	2115-4H		
C 12 P	7/64	8114-4B		
// (C 12 P	7/64			
C 12 R	1:785)			

審査請求 未請求 請求項の数3(全7頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-196140	(71) 出願人	000183657 出光石油化学株式会社 東京都千代田区丸の内3丁目1番1号
(22) 出願日	平成3年(1991)7月11日	(72) 発明者	佐野 敏郎 千葉県袖ヶ浦市上泉1660番地 出光石油化 学株式会社内
		(72) 発明者	東田 雅彦 千葉県袖ヶ浦市上泉1660番地 出光石油化 学株式会社内
		(74) 代理人	弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

(54) 【発明の名称】 トリグリセリドの回収方法

(57) 【要約】

【構成】 トリグリセリド含有微生物菌体からトリグリセリドを抽出するにあたり、該菌体が水に分散した状態で機械的に該菌体を破碎し、脱水した後、カラム中で、n-ヘキサンなどの溶剤と接触させて抽出することを特徴とするトリグリセリドの回収方法。

【効果】 本発明の方法は、抽出効率が高く、微生物菌体中の油脂(トリグリセライド)を効率良く抽出することができる。また、本発明の方法は、使用溶剤が少なくて済む上に、操作が安全であり、しかも簡略なプロセスとなるという実益がある。

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 トリグリセリド含有微生物菌体からトリグリセリドを抽出するにあたり、該菌体が水に分散した状態で該菌体を破碎し、脱水した後、溶剤を用いて抽出することを特徴とするトリグリセリドの回収方法。

【請求項2】 溶剤を用いての抽出が、カラム中で溶剤と接触させることからなる請求項1記載の方法。

【請求項3】 溶剤が、n-ヘキサンである請求項1又は2記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、トリグリセリドの回収方法に関し、詳しくは極めて効率良く、しかも安全に微生物菌体中の油脂（トリグリセリド）を抽出、回収することができる方法に関する。

## 【0002】

【従来技術及び発明が解決しようとする課題】 糸状菌、酵母等の微生物は、油脂生産能を有するため、このような油脂生産能を有する微生物菌体から、油脂を抽出する方法が行なわれている。すなわち、油脂の主成分であるトリグリセリドは、微生物菌体内に蓄積するため、菌体から直接、或いは細胞壁を機械的又は酵素的に破壊し、抽出する方法が知られている。

【0003】 このような技術として、例えば、油脂生産能を有する微生物菌体をエタノールに懸濁し、破碎後、濾過、遠心分離によってエタノールを除いた後、これに抽出溶剤を加えて、懸濁し、破碎抽出する方法が提案されている（特開昭61-170397号公報、同61-227790号公報、同62-44170号公報、同62-179598号公報など）。しかしながら、これらの方法では、2種の溶剤を使用する上、菌体と有機溶剤との分離操作が必要となって、操作が煩雑であるという欠点があった。しかも、これらの方法では、有機溶剤中で破碎するため、火災などの恐れがあり、また過大な設備を必要としていた。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、このような従来の問題点を解決すべく鋭意研究を進めた結果、トリグリセリド含有微生物菌体を水に分散した状態で破碎し、脱水した後、好ましくは菌体をカラムに充填した後、溶剤抽出することにより、極めて効率良く、トリグリセリドが得られることを見い出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0005】 すなわち本発明は、トリグリセリド含有微生物菌体からトリグリセリドを抽出するにあたり、該菌体が水に分散した状態で該菌体を破碎し、脱水した後、溶剤を用いて抽出することを特徴とするトリグリセリドの回収方法を提供するものである。

【0006】 本発明の方法で用いるトリグリセリド含有微生物菌体は、トリグリセリド生産能を有する微生物

を、常法により培養して得られるものである。ここでトリグリセリド生産能を有する微生物としては、糸状菌や酵母など、種々のものが挙げられる。

【0007】 例えば、 $\gamma$ -リノレン酸含有油脂生産能を有する微生物としては、（1）特開昭60-168391号公報等に記載されているモルティエレラ（Mortierella）属に属する微生物、（2）特開昭63-283589号公報等に記載されているムコール（Mucor）属に属する微生物、（3）特開昭63-133994号公報等に記載されているリゾpus（Rhizopus）属に属する微生物などが挙げられる。

【0008】 また、ジホモ $\gamma$ -リノレン酸含有油脂及びアラキドン酸含有油脂の生産能を有する微生物としては、例えば、（4）特開昭63-14696号公報、同63-12290号公報、同63-44891号公報等に記載されているモルティエレラ（Mortierella）属に属する微生物、（5）特開昭64-47384号公報、同64-47385号公報、同63-102688号公報等に記載されているコニディオボラス（Conidiobolus）属に属する微生物などが挙げられる。

【0009】 より具体的には、モルティエレラ（Mortierella）属に属する微生物としては、例えば、モルティエレラ・イサベリナ（Mortierella・isabellina）IFO 7824やモルティエレラ・ラマニア（Mortierella・ramaniana var. angrispora）IFO 8187などが挙げられる。

【0010】 また、ムコール（Mucor）属に属する微生物としては、例えば、ムコール・シルシネロイデス（Mucor・circinelloides）HUT 1121（微研菌寄FER 30 MP-9359）や、ムコール・ジャバニクス（Mucor・javanicus）HUT 1162（微研菌寄FERMP-9360）などが挙げられる。

【0011】 さらにコニディオボラス（Conidiobolus）属に属する微生物としては、例えばコニディオボラス・ヘテロスボラス（Conidiobolus・heterosporus）ATCC 12941、コニディオボラス・ナノデス（Conidiobolus・nanodes）CBS 183/62、コニディオボラス・ランプラウジエス（Conidiobolus・lamprauges）ATCC 12585などが挙げられる。これらは、いずれも油脂（トリグリセリド）を生産する能力を有し、菌体内に蓄量の油脂（トリグリセリド）を蓄積する。

【0012】 このような微生物の培養は、常法により行なえばよい。すなわち、上記微生物を培養するための培地は、該微生物がよく成育して、目的とする油脂（トリグリセリド）を生産しうるものであればよく、例えば、炭素源としてグルコース、澱粉を用い、窒素源として硫酸、尿素の他、脱脂大豆粉、脱脂米糠などの有機窒素源を用いたものが挙げられる。その他、必要に応じて、リン酸塩、マグネシウム塩、マンガン塩、カルシウム塩などの金属塩を添加した培地で、pH、温度を制御しなが

ら培養すればよい。

【0013】このようにしてトリグリセリドを含有する微生物菌体が得られる。トリグリセリドは通常、微生物菌体中に蓄積されるので、微生物の培養終了後、培養液から濾過や遠心分離によって菌体を回収する。

【0014】本発明の方法においては、回収した菌体が水に分散した状態で、該菌体を破碎する。具体的には、回収した菌体を、再度、水に分散・懸濁させながら、或いは水に分散・懸濁させた後、該菌体を破碎する。この水への分散・懸濁時には、菌体の濃度は高い方が良いが、ポンプによる移送時の流動性を考慮し、菌体の濃度を5~18%、望ましくは8~15%に調整する。また、破碎機などを用いての破碎工程での目詰りを防止する為に、予めディスパーム等の分散機を用いて荒破碎を行なうことが望ましい。なお、培養液中の菌体濃度が充分に高く、また、後工程及び製品中に混入等のトラブルを生じるような副産物が培養液にない場合には、菌体分離することなく、直接破碎機に供給することもできる。

【0015】菌体の破碎は、通常、機械的に行なわれ、例えばフレンチプレス、超音波破碎機等を用いたり、或いはガラスピースの存在下でホモジナイズしたり、さらにはボールミルを用いたりすることにより、行なうことができる。

【0016】菌体の分散・懸濁~破碎を連続的に行なうには、一般に乳化、微粉末懸濁液の均質化に用いられている高圧ホモジナイザー型式のものが有効である。また、ダイノーミル、パールミル等も使用することができる。

【0017】なお、水の代りに、懸濁液の温度が50~80℃となるように、温水に懸濁させて、微生物がもつリバーゼを失活させてもよい。これによって、破碎後、乾燥までに起る、リバーゼによるトリグリセライドの分解を防止し、油脂の酸価の上昇を防止することも可能である。

【0018】次に、このようにして破碎した菌体を脱水する。ここで脱水は、菌体の含水率が10%以下、好ましくは5%以下になるように行なえばよく、菌体の含水率が0%となるまで、すなわち完全に乾燥するまで行なう必要は必ずしもない。この脱水は、凍結乾燥機、真空乾燥機、気流乾燥機等、或いはスプレードライヤー、パドルドライヤー、ドラムドライヤー等を用いて行なえばよい。

【0019】このようにして脱水した後、溶剤を用いて、トリグリセライドを抽出し、回収する。抽出に用いる溶剤としては、例えば、n-ヘキサン、エタノール、アセトン、メチルエチルケトン、シクロヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸エチル等が挙げられ、特に抽出率、食品への応用の点からn-ヘキサンが好ましい。

【0020】溶剤を用いての抽出方法には、特に制限は

ないが、特に充填塔（カラム）を用いて抽出を行なうことが好ましい。充填カラムを用いてのトリグリセライドの抽出、回収は、例えば、脱水した破碎菌体を円筒状の充填カラムに詰め、上部より抽出溶剤を流下させ、充填カラム底部より流出する溶剤を集め、濃縮することによって行なうことができる。このようにすれば、溶剤使用量を低減することが可能である。なお、充填カラムの底部には、菌体の洩出を防止するため、適当なサイズの金網を張ったり、或いは珪藻土等の濾過助剤を充填しておくことが好ましい。

【0021】溶剤の使用量は、菌体1kg当たり2~12リットルの割合とすることが好ましく、特に抽出率や経済性を考慮すると、3~5リットルの割合とすることがより好ましい。

【0022】充填カラム底部から流出した溶剤は、減圧濃縮等の常法により、留去することによって、粗油脂（粗トリグリセライド）を得ることができる。必要により、常法によって、さらに精製することもできる。

#### 【0023】

20 【実施例】次に本発明を、実施例により詳しく説明する。

#### 【0024】参考例

以下の実施例、比較例において、全油脂の抽出率を算出する基準となる菌体中の全油脂量は、次の方法により測定した。ムコール・シリシネロイデス(*Mucor circinelloides*) HUT 1121(微研菌寄 FERM P-9359)の菌体を、第1表に示す条件下、30リットル培養槽で大量に培養し、得られたヤーリノレン酸含有菌体を、濾過によって回収した。この回収した菌体を1

30 2%の濃度になるように、再度、水に分散させ、この一部をダブルドラムドライヤーで脱水して、含水率4%の乾燥菌体を得た。この乾燥菌体5gに、直径0.6mmのガラスピーズ100mlおよびn-ヘキサン100mlを加え、ホモジナイザー(日本精機(株)製、エクセルオートホモジナイザーDX-3)により、回転数10000rpmにて3分間ホモジナイズした後、濾過によってガラスピーズと菌体断片を除去した。その後、再度、菌体にn-ヘキサン100mlを加えて、前記と同様のホモジナイズを2回繰り返した。得られた濾液を集め、減圧濃縮40 することにより、黄色油脂1.9gを得た。この結果、菌体には38%の割合で油脂が含まれていることが判った。

#### 【0025】実施例1

ムコール・シリシネロイデス(*Mucor circinelloides*) HUT 1121(微研菌寄 FERM P-9359)の菌体を、第1表に示す条件下、30リットル培養槽で大量に培養し、得られたヤーリノレン酸含有菌体を、濾過によって回収した。この回収した菌体を10%の濃度になるように、均一に水に分散、懸濁させた後、破碎機(マイクロフルイダイヤーM110Y型、マイ

クロフルイダイズ社製)を用いて、 $700\text{ kg/cm}^2$ の圧力で破碎した。その後、破碎菌体を凍結乾燥して、含水率3.4%の乾燥菌体を得た。この乾燥菌体10gを、第1図のように、内径2.0mmのガラス製カラムに充填し、上部より100mlのn-ヘキサンを流した。カラム底部から流出して来たn-ヘキサン・油脂混合物(ミセラ)を回収し、減圧濃縮によってn-ヘキサンを留去した結果、3.4gの油脂を得た。このときの抽出率は90%であった。

#### 【0026】実施例2

ムコール・シルシネロイデス(*Mucor circinelloides*) HUT 1121(微研菌寄 FERM P-9359)の菌体を、第1表に示す条件下、300リットル培養液で培養し、得られた菌体を濾過によって回収した。この回収した菌体を、均一に水に分散、懸濁させて、1.2%の懸濁液を作成した。次いで、高圧ホモジナイザー(イズミフードマシナリ社製、HV-OH-0.7-3.7S)を用いて、圧力 $700\text{ kg/cm}^2$ 、流量60リットル/hで破碎した。破碎した菌体を、ダブルドラムドライヤーを用いて脱水し、含水率3.8%の乾燥菌体粉末を得た。この乾燥菌体粉末700gを、第1図に示すとほぼ同様のカラム(但し、内径5.5mm、全長1400mmであり、コックを設けていない点が異なる。)に充填した後、乾燥菌体粉末に対し、4倍量(2.8リットル)のn-ヘキサンを流下させ、下部から流出するヘキサンから油脂の黄色が消えるまでの流出液2.3リットルを回収した。これを減圧濃縮し、215gの油脂を得た。このときの抽出率は9.4%であった。

#### 【0027】実施例3~8

第1表に示す条件で培養した各種の油脂生産微生物を用いた他は、実施例1と同様にして、培養、破碎、乾燥、抽出を行なった。抽出率を第2表に示す。

#### 【0028】比較例1

ムコール・シルシネロイデス(*Mucor circinelloides*) HUT 1121(微研菌寄 FERM P-9359)の菌体を30リットル培養槽で大量に培養、得られた $\alpha$ -リノレン酸含有菌体を濾過によって回収した。この回収した菌体を12%の濃度になるように、再度、水に分散させ、この一部をダブルドラムドライヤーで乾燥、含水率4%の乾燥菌体を得た。この乾燥菌体10gを、実施例1と同様にして、カラムに充填し、抽出した結果、黄色油脂1.2gを得た。したがって、抽出率は31%であった。

#### 【0029】比較例2

比較例1によって得られた湿菌体(含水率6.5%)100gに、300mlのエタノールを加え、1リットル容のポールミルにて5時間破碎した。破碎後、減圧濾過によってエタノールを除き、残った菌体を集め、n-ヘキサン300mlを加え、再びポールミルにて5時間破碎抽出した。減圧濾過によって、菌体残渣とn-ヘキサンとを分け、得られたヘキサン区分を減圧濃縮することによって、9.2gの油脂が回収できた。このときの抽出率は6.9%であった。

#### 【0030】

#### 【表1】

第1表

		油 脂 生 产 微 生 物		
ムコール・ジャ バニクス	<i>Mucor javanicus</i>	モルティエレラ ・イサベリナ	<i>Mortierella isabellina</i>	コニディオボラス・ヘテロスポ ラス
ムコール・シレン ネロイデス	<i>Mucor circinelloides</i>	モルティエレラ ・ラマニアナ	<i>Mortierella ramaniana var. angrispora</i>	Conidiobolus heterosporus コニディオボラス・ナノデス Conidiobolus nanodes コニディオボラス・ランプラウ ジェス
培 硫安	グルコース 16.5 g/l	250 g/l 16.5 g/l	200 g/l 16.5 g/l	150 g/l —
養 リン酸1カリ	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	9 g/l	9 g/l	1.5 g/l
組 酵母エキス	酵母エキス	1 g/l	1 g/l	0.5 g/l
成 ポリペプトン	ポリペプトン	0.6 g/l	0.6 g/l	1.5 g/l
微 量金屬溶液 *	微量金属溶液 *	—	0.6 g/l	3.0 g/l
培 温 度	8 ml/l	6 ml/l	1 ml/l	
養 条 件	pH	30°C 5 (NaOHで調整)	30°C 3.5 (NaOHで調整)	30°C フリー

\*微量金属溶液:  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  5 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.6 g  
 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.5 g  
 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.1 g, 脱イオン水 1リットル

【0031】

40 【表2】

第2表

実施例番号	油 脂 生 産 微 生 物	抽 出 率
3	モルティエレラ・イサベリナ <i>Mortierella isabellina</i> IFO 7824	92%
4	モルティエレラ・ラマニアナ <i>Mortierella ramaniana</i> var. <i>angrispora</i> . IFO 8187	91%
5	コニディオボラス・ヘテロスボラス <i>Conidiobolus heterosporus</i> ATCC 12941	92%
6	コニディオボラス・ナノデス <i>Conidiobolus nanodes</i> CBS 183/62	93%
7	コニディオボラス・ランプラウジエス <i>Conidiobolus lamprauges</i> ATCC 12585	92%
8	ムコール・ジャバニクス <i>Mucor javanicus</i> HUT 1162	89%

## 【0032】

【発明の効果】本発明の方法は、抽出効率が高く、微生物菌体中の油脂（トリグリセリド）を効率良く抽出することができる。また、本発明の方法は、使用溶剤が少なくて済む上に、操作が安全であり、しかも簡略なプロセスとなるという実益がある。

## 【0033】

## 【図面の簡単な説明】

【図1】第1図は、実施例1で用いたカラムを示す説明図である。

## 【図1】第1図は、実施例1で用いたカラムを示す説明図である。

## 【符号の説明】

a 菌体

b 脱脂綿

c コック弁

【図1】

## 第1図



---

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

識別記号 庁内整理番号 F I

技術表示箇所

(C 12 P 7/64

C 12 R 1:645)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**